

生物活性玻璃纤维的基因转染研究

刘 惠^{1,2,3}, 陈晓峰^{1,2,3}, 李 贤^{1,2,3}, 李玉莉^{1,2,3}, 林泽枫^{1,2,3}

(1. 华南理工大学 材料科学与工程学院, 广州 510640; 2. 国家人体组织功能重建工程技术研究中心, 广州 510006; 3. 广东省生物医学工程重点实验室, 广州 510006)

摘 要: 生物活性玻璃由于含有钙、磷成分, 因此在基因转染方面具有应用潜能。本研究通过溶胶-凝胶结合静电纺丝技术制备了具有连续介孔或分级纳米孔的微纳米生物活性玻璃纤维(BGF), 并将其用于基因转染。实验结果显示, BGF 在无血清培养基中可大量释放 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} , 这些释放的离子在沉积的同时可装载质粒 DNA, 起到基因转染载体的作用, 转染效率与 BGF 之间具有剂量依赖性。当质粒浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 、BGF 浓度为 $1000 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞的转染效率可达对照组(脂质体转染试剂)的 50% 以上。其转染机理与传统的磷酸钙基因转染类似, 而其较好的离子溶出保障了其使用的稳定性, 有望替代纳米磷酸钙转染体系用于基因传输。

关 键 词: 生物活性玻璃; 纤维; 基因转染; 磷酸钙

中图分类号: TQ174 文献标识码: A

Gene Transfection of Bioactive Glass Fibers

LIU Hui^{1,2,3}, CHEN Xiao-Feng^{1,2,3}, LI Xian^{1,2,3}, LI Yu-Li^{1,2,3}, LIN Ze-Feng^{1,2,3}

(1. School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China; 2. National Engineering Research Center for Tissue Restoration and Reconstruction, Guangzhou 510006, China; 3. Key Laboratory of Biomedical Engineering in Guangdong, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Bioactive glasses (BGs) exhibit potential applications for gene transfection because of their composition including Ca and P. Here, bioactive glass fibers (BGFs) with mesopores or hierarchical nanopores, were prepared by electrospinning process using BGs Sol-Gel precursor and its effect on mediating gene transfection was investigated. The results indicate that BGF acts as a gene vector by releasing Ca^{2+} and PO_4^{3-} , and then reunions them along with plasmid DNA in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). BGFs have a dose-dependent manner in transfection efficiency. When using $1 \mu\text{g/mL}$ plasmid, the transfection efficiency of BGF with concentration at $1000 \mu\text{g/mL}$ is higher than 50% of lipofectamine LTX_PLUS. The transfection mechanism of BGF is similar to that of calcium phosphate (CaP) system. Furthermore, BGF's sufficient ions releasing ensures stability and effectiveness to be applied in gene transfection, which makes BGF a promising candidate for gene delivery in replace of traditional gene carrier, the nano-calcium phosphate system.

Key words: bioactive glass; fiber; gene transfection; calcium phosphate

收稿日期: 2014-02-19; 收到修改稿日期: 2014-04-03

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2011CB606204); 国家自然科学基金(51172073, 51202069); 高等学校博士学科点专项科研基金(20110172110002); 中央高校基本科研业务费专项资金(2014ZM0009, 2013ZM004, 2012ZP0001) National Key Basic Research Program (973 Program) of China (2011CB606204); National Natural Science Foundation of China (51172073, 51202069); Specialized Research Fund for Doctoral Program of Higher Education of China (20110172110002); Fundamental Research Funds for the Central University (2014ZM0009, 2013ZM004, 2012ZP0001)

作者简介: 刘 惠(1989-), 女, 硕士. E-mail: half0614@yeah.net

通讯作者: 陈晓峰, 教授. E-mail: chenxf@scut.edu.cn

组织缺损修复时,除需三维支架以提供细胞粘附生长的三维环境外,还需加入微量的细胞生长因子或导入能表达相应因子的基因,以加快组织修复。但单纯的基因 DNA 分子片段难以透过细胞膜,需要借助各种辅助载体才能将目的基因导入细胞内,使其进入细胞核进行复制、转录、表达。目前所用的基因载体主要包括两大类:病毒载体和非病毒载体。病毒载体虽然转染效率高,但存在免疫原性和致癌性^[1-2]等副作用。而非病毒载体一般具有良好的生物相容性、较低的免疫原性、易于制备等优点。常用的非病毒载体有脂质体、阳离子聚合物、树枝状大分子、多肽及磷酸钙纳米粒等^[3-4]。

磷酸钙纳米粒用于基因转染已有 40 多年^[5]历史,最初通过制备含 DNA 的磷酸钙纳米粒直接作用于细胞^[4],但该磷酸钙纳米粒随制备时间的延长极易聚集而降低转染效率。为避免纳米粒制备时尺寸难以控制的问题,Shen 等^[6]通过共沉淀法在基底材料表面沉淀含 DNA 的低结晶度磷酸钙复合层,通过矿物层的再溶解成功介导细胞的转染。进一步研究表明,共沉淀含脂质体/质粒复合粒的磷酸钙矿化层^[7],或通过矿化层表面吸附脂质体/质粒复合粒^[8],能在一定程度上增强基因的转染效率。但这类磷酸钙矿化层的组成和结构对基因转染过程至关重要,而这通常较难控制,且重复性差。

从上述研究来看,寻求一种能稳定释放 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 的材料对基因转染来说是技术的关键。生物活性玻璃在模拟体液中能较稳定地释放 Ca^{2+} 与 PO_4^{3-} 等,提示其具有潜在的基因转染功能,相关研究尚未见报道。而采用溶胶-凝胶法结合静电纺丝技术制备的生物活性玻璃纤维,不仅具有良好的生物活性,可使所得支架强度有所提高^[9],同时还具有较好的药物负载特性^[10]。本研究探索采用这种生物活性玻璃纤维用作基因转染的可能性,并揭示其基因转染机理,为组织工程多功能生物活性玻璃三维支架的制备提供基础。

1 实验方法

1.1 实验材料

本实验主要用到的原料如下:正硅酸乙酯 (TEOS)、磷酸三乙酯 (TEP)、硝酸钙 (CN)、无水乙醇、浓盐酸均购自广州试剂有限公司;聚乙烯醇缩丁醛 (PVB) (阿拉丁), Lipofectamine LTX PLUS (Invitrogen), DMEM (Gibco), DNA Marker (上海依科赛生物制品有限公司),琼脂糖 (GENE),质粒提取试剂盒 (OMEGA), Gelred (Biotium), 编码带有绿色

荧光蛋白的骨活素 (Osteoactivin, OA) 基因的质粒 (pAcGFP1-N1-OA, 本实验室重组构建), 人胚胎肾上皮细胞 (293T) (由本实验室保存)。

1.2 生物活性玻璃纤维的制备

先配制组分为 $58\text{S}(60\text{Si}_2\text{O}-36\text{CaO}-4\text{P}_2\text{O}_5)$ 的生物活性玻璃溶胶前驱体,随后将其室温陈化 2 d,加入 PVB 使其最终质量体积分数为 5%,磁力搅拌至溶液透明,即可用于静电纺丝。静电纺丝参数为:工作距离 12 cm, 平均电压 20 kV, 液体流速为 1 mL/h。将所得纤维真空干燥后, 650°C 热处理 3 h 即得 BGF。

1.3 BGF 对质粒 DNA 的络合

将 2 mg 灭菌后的生物活性玻璃纤维,分散于 2 mL 无血清细胞培养液中,得到含生物活性玻璃纤维为 1 mg/mL 的培养液,取此液体 450 μL ,向其中添加 0.5 μg 的质粒 DNA,混匀后置于 37°C 孵育 6 h。离心取等量上清液用于琼脂凝胶电泳,紫外凝胶成像仪拍照以讨论 BGF 对质粒的络合作用。

1.4 细胞转染

293T 以 3×10^4 cells/ cm^2 的细胞量接种到 24 孔板中,培养 24 h 后,将培养液替换成孵育 6 h 的 BGF/质粒混合液,同时补充体积分数为 10% 的胎牛血清,培养箱孵育 1 d 后荧光显微镜观察转染效果。

将细胞用 PBS 清洗、0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化、血清中和后,收集细胞用于流式细胞仪检测。

1.5 表征方法

通过扫描电子显微镜 (SEM) 和透射电子显微镜 (TEM) 观察生物活性玻璃纤维的形貌和内部结构,通过荧光倒置显微镜观察细胞的形态和荧光表达量,通过电感耦合等离子体发射光谱仪测量溶液中的离子浓度,通过琼脂凝胶电泳检测质粒 DNA、流式细胞仪检测细胞转染效率。

2 结果与讨论

2.1 生物活性玻璃纤维的制备

利用静电纺丝和溶胶-凝胶技术相结合的方法,可得到不同组分、不同尺寸和结构的 BGF,其工艺流程如图 1 所示。通过调节工艺参数,可得到不同 Si、Ca、P 比,直径范围为 0.2~5 μm ,内部具有连续介孔或分级纳米孔的微纳米生物活性玻璃纤维,如图 2 所示,这种 BGF 表现出较好的生物活性。

2.2 生物活性玻璃纤维对质粒的作用

研究 BGF 在基因转染方面的潜能,首先必须了

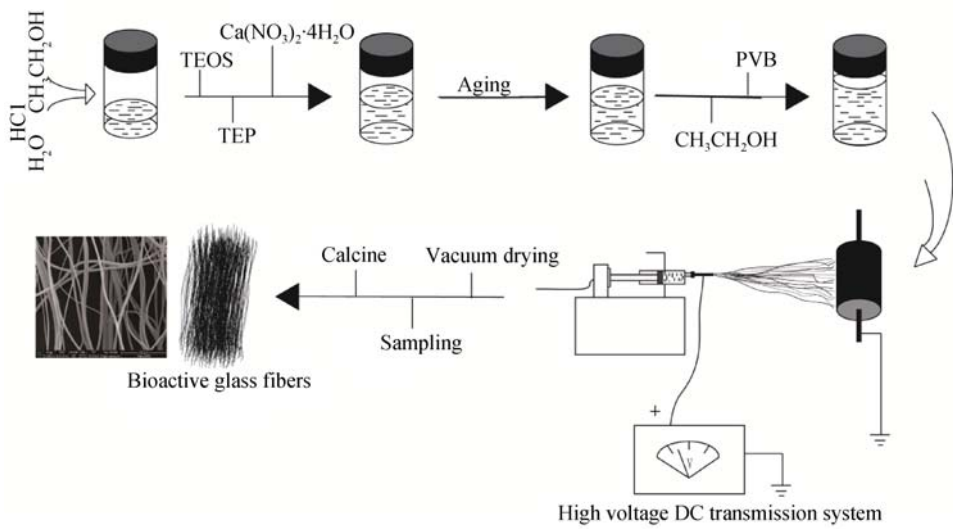


图 1 生物活性玻璃纤维的制备流程图
Fig. 1 Schematic of the BGF preparation process

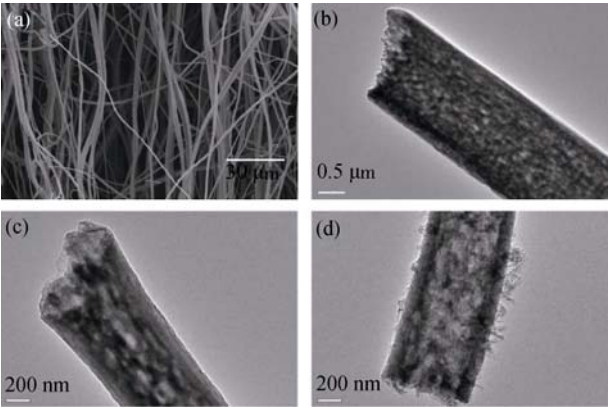


图 2 生物活性玻璃纤维的 SEM 形貌(a)及其不同内部结构的 TEM(b, c)以及矿化 6 h 后的 TEM(d)照片
Fig. 2 SEM image (a) and TEM images of different inner structure (b,c) and structure after mineralization for 6 h (d) of BGFs

解其对质粒是否有作用。图 3 所示为质粒的琼脂凝胶电泳结果, 随培养液中 BGF 含量的减少, 对应的电泳条带变得清晰明亮, 即相应溶液中质粒含量较高, 表明 BGF 对质粒有一定的络合作用, 且随 BGF 含量的增多, 其络合能力增强。

不过这种作用不可能是 BGF 对 DNA 的直接作用。这主要是因为溶液中质粒 DNA 带负电, 生物活性玻璃纤维由于表面 Ca^{2+} 的快速溶出而形成一层富含 Si-OH 的凝胶层也带负电, 因此二者相互排斥。体系中能与质粒直接作用的是 Ca^{2+} , 而溶液中的 BGF 会持续释放 Ca^{2+} , 很可能是 Ca^{2+} 在 DNA 与 BGF 间提供了桥梁作用。研究表明 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 在浓度过饱和时会发生沉积, 且溶液中的 DNA 会迅速地被形成的 Ca、P 化合物包裹^[11], 这也为离子作用

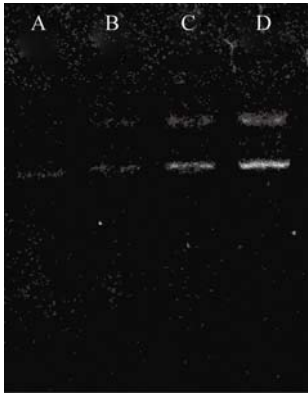


图 3 生物活性玻璃络合质粒 DNA 后的琼脂糖凝胶电泳结果
Fig. 3 Agar gel electrophoresis of pAcGFP-OA after complexing with BGF
A-D: BGF concentrations at 1000, 700, 400 and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively

假设提供了依据。DMEM 中, BGF 近表面处的 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 极易过饱和, 在质粒存在的时候, 会在 BGF 表面沉积负载质粒的磷酸钙矿化层, 从而降低溶液中的质粒含量。

2.3 生物活性玻璃纤维的基因转染

将含质粒 DNA 的 BGF 用细胞培养液稀释为 100、200、400、600、800、1000、1300、1650、2000 $\mu\text{g/mL}$ 转染 293T 细胞 24 h 后, 荧光显微镜观察结果如图 4 所示。一定剂量的 BGF 的范围(100~1300 $\mu\text{g/mL}$)内成功转染的细胞数随浓度的增大而增多, 这与 BGF 携带所络合的质粒量有关。但较高浓度下(1650~2000 $\mu\text{g/mL}$)随 BGF 的增多, 成功转染的细胞数又显示出下降趋势, 这可能是 BGF 较多时, 溶液的碱性也随离子释放过程而增强, 从而降低细胞的活力所致。

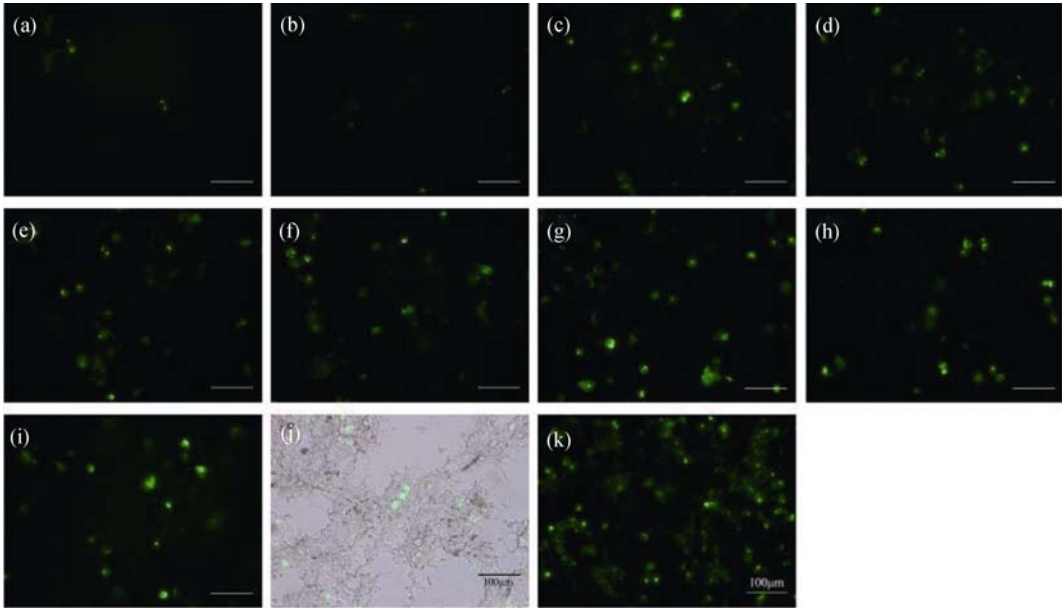


图 4 含绿色荧光蛋白质粒的 BGF 稀释不同浓度后转染 293T 细胞的荧光显微镜照片

Fig. 4 Fluorescent images of 293T cell after transfection with GFP plasmid-contained BGF at different concentrations
a-i: BGF concentration at 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300, 1650 and 2000 $\mu\text{g/mL}$, respectively; j: Merged image from fluorescence and bright field images of 293T cell after transfection by GFP plasmid-contained BGF at 400 $\mu\text{g/mL}$; k: Image of positive control transfected by Lipofectamine.
Bars in all images are 100 μm

本实验进一步通过流式细胞仪检测了 BGF 浓度不超过 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时的细胞转染效率(表 1)。其结果与荧光显微镜所观察到的现象相吻合。当质粒浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$, BGF 浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞的转染效率能达到使用脂质体转染试剂时的 50% 以上 (21.3/38.3)。当使用相同浓度的 BGF 时, 提高使用质粒的浓度, 也能提高转染效率。

2.4 生物活性玻璃纤维基因转染机理的探讨

为探究 BGF 的基因载体作用与材料化学组成、形貌的关系, 本实验对组成分别为 Si-Ca-P、Si-P、Si-Ca 的三种纤维的基因转染能力进行了考察。所得结果如图 5 所示, 不含 Ca 的纤维(Si-P)不能转染细胞, 含钙的两种纤维中, 三组分的转染效果优于两组分。这说明材料的基因载体作用与材料的纤维状形貌无关, 而与材料的组成直接相关。钙元素赋予了材料基因转染能力, 而钙在磷存在时转染能力增强。

为探究 BGF 的基因载体作用与材料结构的关系, 分别采用传统溶胶-凝胶法^[12]制备具有较致密结构的不规则块状生物活性玻璃、采用模板法结合

溶胶-凝胶法^[13-14]制备的具有较致密结构的单分散微纳米生物活性玻璃微球, 与具有连通介孔结构的 BGF 用于基因转染作对比研究, 三种材料的组成均按 58S(60mol%SiO₂-36mol%CaO-4mol%P₂O₅) 组成设计, 所得结果如图 6 所示。三种结构的生物活性玻璃均能介导基因转染, 这进一步说明了形貌对基因转染起决定性因素。通过荧光显微镜观察到以 BGF 为载体所介导的表达荧光蛋白的细胞数最多, 而颗粒最小的介孔微纳米生物活性玻璃并没有表现出较好的转染效果。

由于材料结构差异会直接影响其在溶液中的离子溶出量, 因此对三种不同生物活性玻璃在 DMEM 中孵育 6 h 的浸提液进行 Si、Ca、P 元素分析, 以揭示结构对转染的影响。所得结果如图 7 所示, 三种生物活性玻璃表现出不同的离子溶出特性, 其中转染效果最佳的 BGF, 具有最大的 Ca²⁺溶出能力和 PO₄³⁻沉积能力, 即具有最好的磷酸钙形成能力。这也进一步说明材料近表面处 Ca²⁺、PO₄³⁻的含量和沉积能力是影响细胞转染效率的关键。Choi 等^[8]发现, 不同磷酸钙矿化层对基因转染的调控能力与形貌几乎无关,

表 1 293T 细胞转染效率的流式细胞仪结果

Table 1 Transfection efficiency of 293T cells measured by flow cytometry

Concentration (BGF) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0	200	400	600	800	1000	600	600	0(Lipofectamine)
Amount of GFP Plasmid /($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1	1	1	1	1	1	2	4	1
Transfection efficiency /%	0	0.12	0.68	5.74	14.40	21.30	10.40	15.70	38.30

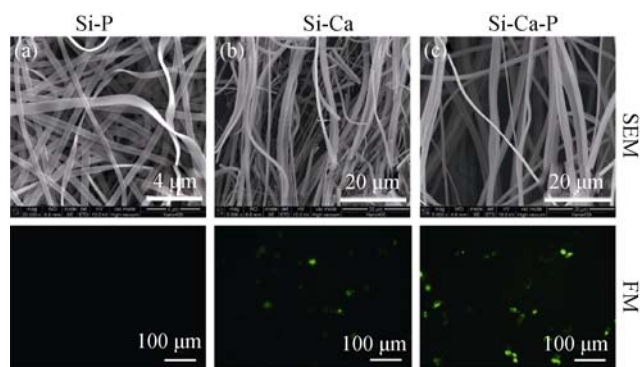


图 5 不同组成的纤维 SEM 照片和等量纤维转染 293T 细胞的荧光显微镜照片

Fig. 5 SEM images of fibers with different compositions and fluorescence microscope (FM) images of 293T cells transfected by equivalent fibers

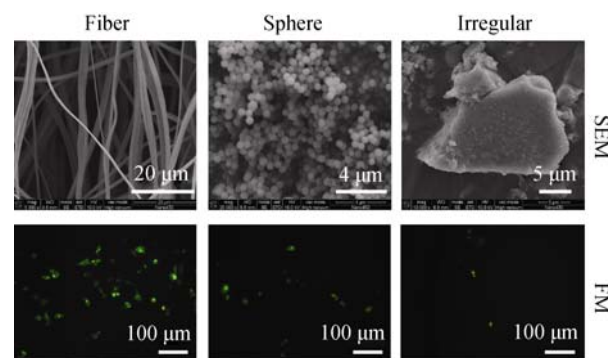


图 6 不同生物活性玻璃的 SEM 照片和等量材料转染 293T 细胞的荧光显微镜照片

Fig. 6 SEM images of different type of bioactive glasses and fluorescence microscope (FM) images of 293T cells transfected by equivalent fibers

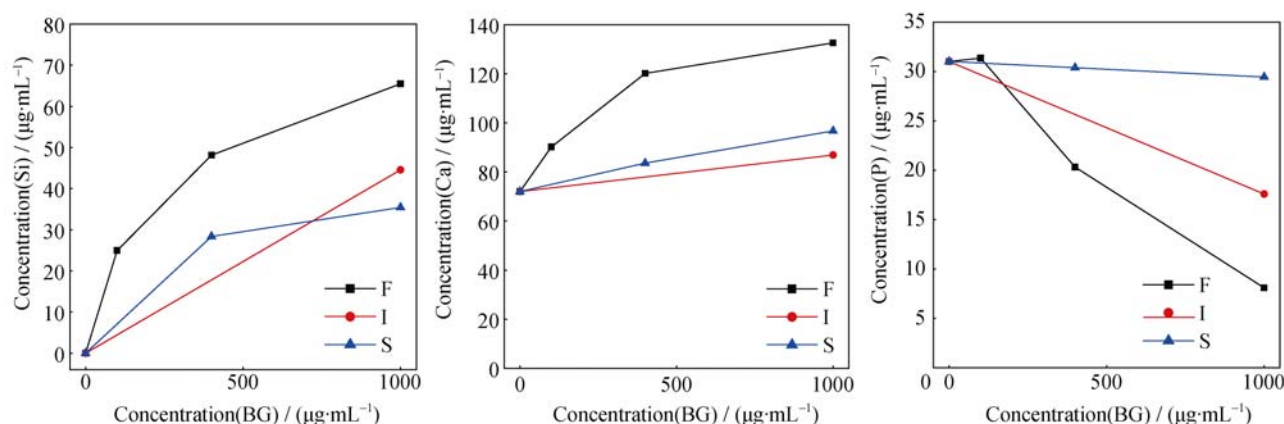


图 7 不同形貌(F 纤维, S 球形, I 不规则)生物活性玻璃在 DMEM 中浸泡 6 h 后, 溶液中的离子浓度曲线。

Fig. 7 Ion release profiles of different types of BGs after soaking in DMEM for 6 h

F: Fiber; S: microsphere; I: Irregular

而主要决定于其释放 Ca^{2+} 能力。我们的结果与他们的结果相吻合。另外, Sandhu 等^[15]也发现 Ca^{2+} 通过与 PO_4^{3-} 沉积可增强基因转染。

众所周知, 裸质粒没有保护时, 在细胞内外很容易降解^[16]。实验中所观察到的荧光为所用质粒表达后的蛋白所发出, 说明其基因必然在某种保护作用下才得以跨越转染过程中的各种屏障, 从而实现表达^[17]。通过对具有不同组成、形貌、结构的生物玻璃的基因转染研究发现, BGF 是通过其快速释放的 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 在材料近表面处于过饱和状态下, 发生沉淀的同时络合了溶液中的质粒, 相当于对质粒作了细胞外的保护, 随后所形成的沉积复合物经历同传统 Ca、P 材料的基因转染载体相同的路径而使质粒基因成功表达。

3 结论

利用溶胶-凝胶法与静电纺丝技术相结合的方

法, 制得的具有连通纳米孔结构的 BGF, 具有一定的基因载体作用。在不超过 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内, 其装载质粒对细胞的转染效率随 BGF 浓度的增大而增大, 同时也随质粒浓度的增大而增大。相较于其他方法制备的生物活性玻璃, BGF 作为质粒载体转染效率最好, 主要是其能快速释放 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} , 并易于在材料近表面处形成沉淀, 沉淀过程中可络合质粒 DNA, 从而起到传统磷酸钙基因转染载体的作用。该方法作为对磷酸钙介导的基因转染体系的补充与丰富, 可有效避免制备磷酸钙纳米粒时容易聚集的缺点, 克服了制备磷酸钙矿化层中矿物组成和溶解性难以控制的缺点, 为磷酸钙体系介导基因转染提供了新途径。

参考文献:

- [1] MARSHALL E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 1999, **286**(5448): 2244-2245.

- [2] HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, *et al.* A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*, 2003, **348**(3): 255–256.
- [3] MINTZER M A, SIMANEK E E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chemical Reviews*, 2009, **109**(2): 259–302.
- [4] ROY I, MITRA S, MAITRA A, *et al.* Calcium phosphate nanoparticles as novel non-viral vectors for targeted gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, **250**(1): 25–33.
- [5] GRAHAM F L, VAN DER EB A J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 1973, **52**(2): 456–467.
- [6] SHEN H, TAN J, SALTZMAN W M. Surface-mediated gene transfer from nanocomposites of controlled texture. *Nature Materials*, 2004, **3**(8): 569–574.
- [7] LUONG L N, MCFALLS K M, KOHN D H. Gene delivery via DNA incorporation within a biomimetic apatite coating. *Biomaterials*, 2009, **30**(36): 6996–7004.
- [8] CHOI S, YU X H, JONGPAIBOONKIT L, *et al.* Inorganic coatings for optimized non-viral transfection of stem cells. *Scientific Reports*, 2013, **3**: 1567.
- [9] KIM H W, KIM H E, KNOWLES J C. Production and potential of bioactive glass nanofibers as a next-generation biomaterial. *Adv. Funct. Mater.*, 2006, **16**: 1529–1535.
- [10] HONG Y L, CHEN X S, JING X B, *et al.* Preparation bioactivity and drug release of hierarchical nanoporous bioactive glass ultrathin fibers. *Adv Mater*, 2010, **22**(6): 754–758.
- [11] JORDAN M, SCALLHORN A, WURM F M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Research*, 1996, **24**(4): 596–601.
- [12] LI R, CLARK A E, HENCH L L. An investigation of bioactive glass powders by Sol-Gel processing. *Journal of Applied Biomaterials*, 1991, **2**(4): 231–239.
- [13] HU Q, CHEN X F, ZHAO N R, *et al.* Facile synthesis and in vitro bioactivity of monodispersed mesoporous bioactive glass sub-micron spheres. *Materials Letters*, 2013, **106**: 452–455.
- [14] HU Q, CHEN X F, ZHAO N R, *et al.* Fabrication and characterization of dodecylamine derived monodispersed mesoporous bioactive glass sub-micron spheres. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2014, **69**: 9–16.
- [15] SANDHU A P, LAM A M I, FENSKE D B, *et al.* Calcium enhances the transfection potency of stabilized plasmid–lipid particles. *Analytical Biochemistry*, 2005, **341**(1): 156–164.
- [16] MUMPER R J, WANG J J, KLAKAMP S L, *et al.* Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle. *Journal of Controlled Release*, 1998, **52**(1): 191–203.
- [17] WIETHOFF C M, MIDDLEAUGH C R. Barriers to nonviral gene delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, **92**(2): 203–217.